

## 明細書

ポリエチレングリコール修飾半導体ナノ粒子、その製造法及び生物学的診断用材料  
技術分野

本発明は、ポリエチレングリコール(PEG)によって修飾された、水溶性のナノメートルサイズの半導体ナノ粒子、その製造法及び該粒子を有する生物学的診断用材料に関する。

## 背景技術

II-VI 族の半導体ナノ結晶は、例えば、米国特許第 6207229 号明細書において、配位性溶媒であるトリアルキルフォスフィン／トリアルキルフォスフィンオキシド中において合成されることが報告されている。該半導体ナノ結晶は、バルクの半導体とは異なる光学特性を有することが知られている。例えば、半導体ナノ結晶は、そのサイズを制御することにより様々な波長の光や発色を示し、また、吸収帯が広く、単一波長の励起光により発光させることができる。更に、その蛍光スペクトルは、幅が狭く良好な対称形を示す。更にまた、半導体ナノ結晶は、有機色素に比べて耐久性、耐退色性に優れる等の特徴を有する。従って、半導体ナノ結晶は、表示素子、記録材料等の光学、電子分野への応用のみならず、蛍光マーカー、生物学的診断用途への応用研究が近年盛んに行われている。

半導体ナノ結晶である量子ドットは、それ自身水に不溶であるため、生物学的診断に用いる場合、結晶表面を改質／修飾することにより水中に安定分散させる必要がある。これまでに、量子ドットの水溶化方法としては、メルカプトエタノールやチオグリセロールを、またメルカプトウンデカン酸やリボ酸等の低分子チオール化合物を半導体ナノ結晶の表面に結合させる方法が報告されている(例えば、Jornal of Physical Chemistry B,103,3065(1999)、米国特許第 6319426 号明細書参照)。

しかし、これらの水溶化剤は、生物学的診断法において、非特異的吸着が十分抑制できず、微量の目的物質のみを高感度で検出する際に問題が生じる。

また、オクチルアミンを部分修飾したポリアクリル酸を用いて ZnS シェルを有する CdSe 半導体ナノ結晶を水中に分散させる報告がなされている(例えば、Nature Biotechnology,オンラインバージョン 2(2002)参照)。しかし、この方法は、半導体ナノ結晶の水溶化に 3 段階の工程を要するために、非常に煩雑である。

更に、生物学的診断用材料として、連結剤を介して親和性分子を結合させた半導体ナノ結晶の概念が示された文献も開示されている(例えば、米国特許第 5990479 号明

細書参照)。しかし、該文献には、連結剤に関して非特異的吸着の抑制に関する配慮がなされておらず、しかも実施例においては半導体ナノ結晶の製造が示されるのみで、親和性分子を結合させた例は示されていない。

更にまた、生物学的診断用材料として、片末端にチオール基を有するポリアルキレングリコールを、ZnS シェルを有する CdSe 等の半導体ナノ結晶に結合させ、該半導体ナノ結晶を水溶化させる技術も提案されている(例えば、特開 2002-121549 号公報参照)。しかし、該文献に記載された実施例には、ポリアルキレングリコールとして短鎖のトリアルキレングリコールの誘導体を用いた例が示されるに過ぎず、長鎖のポリアルキレングリコールを用いた例は示されていない。このようなトリアルキレングリコール誘導体を結合させた半導体ナノ結晶を、例えば、生物学的診断用材料に使用する場合は、特定の物質に対して特異的親和性を有する有機分子を安定に結合させることができず、また非特異的吸着抑制効果が十分でなく、更には生理条件下において半導体ナノ結晶を安定に分散させることができないという問題が生じる。

また、上記短鎖のトリアルキレングリコール誘導体等の低分子チオール化合物を半導体ナノ結晶の水溶化に用いた場合には、有機溶媒中に比べて蛍光強度が著しく低下するという問題が生じることも知られている(例えば、Journal of Colloids and Surfaces, 202, 145(2002)参照)。

#### 発明の開示

本発明の目的は、蛍光強度の低下が有効に抑制され、水中に安定分散させることができ、また、特異的認識能を有する生体分子の結合が容易な PEG 修飾半導体ナノ粒子を提供することにある。

本発明の別の目的は、蛍光強度の低下が有効に抑制され、水中に安定分散させることができ、しかも生物学的診断に適した PEG 修飾半導体ナノ粒子及び該粒子を用いた生物学的診断用材料を提供することにある。

本発明の他の目的は、蛍光強度の低下が有効に抑制され、水中に安定分散させることができる半導体ナノ粒子を、簡便に製造することができる PEG 修飾半導体ナノ粒子の製造法を提供することにある。

本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意検討した、まず、特定の II-VI 族半導体ナノ粒子を水溶化すると共に、例えば、生理条件下においても有機溶媒中に比して顕著な蛍光強度の低下が抑制できる半導体ナノ結晶の水溶化剤について検討した。その結果、特定分子量範囲の片末端がチオール基である PEG が有用であることに注

目した。しかし、このような PEG は、上記特開 2002-121549 号公報に記載の方法を用いても、例えば、ZnS シェルを有する CdSe 半導体結晶等に十分結合させることができなかった。そこで、更に検討した結果、カドミウムを介することにより、特定分子量範囲の片末端がチオール基である PEG を、ZnS シェルを有する CdSe 半導体結晶等に容易に結合させることができること、更には、該 PEG の他端に特定の官能基を設けることにより、生物学的診断用材料への応用が容易になることを見出し本発明を完成した。

本発明によれば、片末端にチオール基を有する数平均分子量 300~20000 の PEG と、ZnX(X は O、S、Se 又は Te を示す)のシェルの有するコアシェル構造の II-VI 族半導体ナノ結晶とが、カドミウムを介して結合した構造を含み、且つ水溶性である PEG 修飾半導体ナノ粒子が提供される。

また本発明によれば、前記 PEG が、片末端がチオール基、他端がアルデヒド基、水酸基、アミノ基及びカルボキシル基からなる群より選択される官能基(A)を有する、ヘテロ二官能 PEG である前記半導体ナノ粒子が提供される。

更に本発明によれば、前記ヘテロ二官能 PEG の官能基(A)に、特異的認識能を有する生体分子が結合してなる前記半導体ナノ粒子が提供される。

更にまた本発明によれば、片末端にチオール基を有する数平均分子量 300~20000 の PEG 水溶液と、カドミウム塩と、ZnX(X は、O、S、Se 又は Te を示す)のシェルの有するコアシェル構造の II-VI 族半導体ナノ結晶の溶液とを反応させる前記半導体ナノ粒子の製造法が提供される。

また本発明によれば、片末端にチオール基を有する数平均分子量 300~20000 のポリエチレングリコール水溶液とカドミウム塩とを反応させる工程(A-1)と、次いで、ZnX(X は、O、S、Se 又は Te を示す)のシェルの有するコアシェル構造の II-VI 族半導体ナノ結晶を反応させる工程(B-1)とを含む前記半導体ナノ粒子の製造法。

更に本発明によれば、表面にカドミウムを有する半導体ナノ結晶の溶液を得るために、ZnX(X は、O、S、Se 又は Te を示す)のシェルの有するコアシェル構造の II-VI 族半導体ナノ結晶の表面にカドミウムを付加する工程(A-2)と、得られた表面にカドミウムを有する半導体ナノ結晶の溶液と、片末端にチオール基を有する数平均分子量 300~20000 の PEG 水溶液とを反応させる工程(B-2)とを含む前記半導体ナノ粒子の製造法が提供される。

更にまた本発明によれば、片末端にチオール基、他端にアルデヒド基、水酸基、ア

ミノ基及びカルボキシル基からなる群より選択される官能基(A)を有する数平均分子量 300~20000 のヘテロ二官能 PEG の前記官能基(A)に、特異的認識能を有する生体分子が結合してなる PEG 修飾半導体ナノ粒子を含む生物学的診断用材料が提供される。

#### 図面の簡単な説明

図 1 は、実施例 3 において測定した量子ドットからテキサスレッドへのエネルギー移動現象の測定結果を示すグラフである。

#### 発明の好ましい実施の態様

以下、本発明につき更に詳細に説明する。

本発明の PEG 修飾半導体ナノ粒子(以下本発明の粒子ということがある)は、少なくとも片末端にチオール基を有する特定分子量の PEG と、特定の半導体ナノ結晶とがカドミウムを介して結合した構造を含む水溶性の半導体ナノ粒子であり、量子ドット等として機能する。

ここで、水溶性とは、本発明の粒子を水に分散させた場合、目視的に濁りのない透明な溶液を与える状態を示すことを意味する。

本発明の粒子を構成する特定の半導体ナノ結晶は、 $\text{ZnX}$ (X は、O、S、Se 又は Te を示す)のシェル、即ち、 $\text{ZnO}$ 、 $\text{ZnS}$ 、 $\text{ZnSe}$  又は  $\text{ZnTe}$  のシェルを有するコアシェル構造の II-VI 族半導体ナノ結晶である。

該半導体結晶のコアは、シェルを形成する半導体化合物と異なり、且つ本発明の所望の目的が達成できれる II-VI 族半導体化合物であれば特に限定されない。好ましくは、 $\text{CdS}$ 、 $\text{CdSe}$ 、 $\text{CdTe}$ 、 $\text{ZnS}$ 、 $\text{ZnTe}$  又はこれらの 2 種以上等が挙げられる。

本発明の粒子を生物学的診断用材料に用いる場合に特に好ましい半導体ナノ結晶のシェルとコアの組合せとしては、粒径分布が狭いものが好ましく、例えば、コアが  $\text{CdS}$  及び／又は  $\text{CdSe}$  であり、シェルが  $\text{ZnS}$  である半導体ナノ結晶が好ましい。このような粒径分布の狭い II-VI 族半導体ナノ結晶は、配位性溶媒であるトリアルキルフォスフィン／トリアルキルフォスフィンオキシド中において合成されることが知られている(米国特許第 6207229 号明細書)。

前記半導体ナノ結晶の粒径は、通常 1~10nm、量子効果による吸発光波長の制御の点で 2~8nm が好ましい。また、前記半導体ナノ結晶の粒度分布は、特に限定されないが、生物学的診断用材料に用いる場合には、通常、標準偏差として  $\pm 20\%$  以内、特に  $\pm 10\%$  以内が好ましい。

本発明の粒子を構成する特定分子量の PEG は、片末端にチオール基を有する、数平均分子量が 300～20000、好ましくは 500～10000、特に好ましくは 1000～7000 の PEG である。数平均分子量が 300 未満では、得られる量子ドットの非特異的吸着抑制能が十分でなく、20000 を超えると PEG 自身の排除体積の問題により、前記半導体結晶表面へ十分結合させることができないので好ましくない。

前記特定分子量の PEG は、単一の数平均分子量からなるものに限定される必要はない。即ち、好ましい 2 種以上の数平均分子量の混合物であっても良い。

前記特定分子量の PEG は、少なくとも片末端にチオール基を有していれば良いが、例えば、生物学的診断用材料に用いる場合には、片末端がチオール基、他端がアルデヒド基、水酸基、アミノ基及びカルボキシル基からなる群より選択される官能基(A)を有する、即ち、両末端に異なる官能基を有するヘテロ二官能 PEG であることが好ましい。

前記ヘテロ二官能 PEG は、例えば、式  $X^1R^1-(CH_2CH_2O)_n-R^2SH$  で表される。ここで、式中  $R^1$  は、炭素数が 0～7 の炭化水素基を示し、 $R^2$  は炭素数 1～7 の炭化水素基を示し、 $X^1$  はアルデヒド基、水酸基、アミノ基又はカルボキシル基を示す。また  $n$  は、5～450 の整数である。

本発明の粒子を構成する PEG として、前記式で示されるヘテロ二官能性 PEG を用いることにより、タンパク等の非特異的吸着を抑制する機能が付与でき、ドラッグデリバリーシステムや生理活性物質の分野でも有効に用いることが可能になり、生物学的診断の際に問題となるバックグラウンドやノイズを効果的に低減することができる。

前記ヘテロ二官能性 PEG は、例えば、3,3-ジエトキシ-1-プロパノールを開始剤とし、エチレンオキシドを重合させて  $\alpha$ -アセタール- $\omega$ -ヒドロキシル PEG を得、得られた PEG のヒドロキシル基を官能基変換する方法等により得ることができる (Bioconjugate Chemistry, 11(6) 947(2000))。

このような方法においては、例えば、通常の PEG と同様に、開始剤／エチレンオキシドの量的関係を制御することにより任意の分子量のヘテロ二官能性 PEG を容易に合成でき、また通常の PEG と同様に、単分散なヘテロ二官能性 PEG が得られる他、 $\alpha$  及び  $\omega$  末端の官能基をほぼ定量的に導入したヘテロ二官能性 PEG も容易に得ることができる。

例えば、ヘテロ二官能性 PEG として  $\alpha$ -アルデヒド- $\omega$ -ヒドロキシル PEG は、 $\alpha$ -アセタール- $\omega$ -ヒドロキシル PEG の末端水酸基を、メタンスルホニルクロリドにより

メシル化した後、O-エチルジチオ炭酸カリウムによりジチオカーボネート化、更にアルキルアミンにより還元チオール化し、更に酸処理することにより得られる。また、 $\alpha$ -ヒドロキシ- $\omega$ -チオール PEG、 $\alpha$ -カルボキシル- $\omega$ -チオール PEG、 $\alpha$ -アミノ- $\omega$ -チオール PEG は、それぞれ、 $\alpha$ -アルデヒド- $\omega$ -チオール PEG を還元、酸化、アンモニア処理した後、還元アミノ化することにより得られる。

本発明の粒子は、前記半導体ナノ結晶と、前記ヘテロ二官能性 PEG 等の特定分子量の PEG が、カドミウムを介して結合した半導体ナノ粒子であるが、該カドミウムは、前記 PEG が有するチオール基と、前記半導体ナノ結晶のシェル表面と結合する。本発明の粒子はこのような構造を採ることにより、蛍光強度を保持した状態で、水中に安定分散又は溶解させることができる。

本発明の粒子は、例えば、生物学的診断用材料とする場合には、前記ヘテロ二官能 PEG の官能基(A)に、特異的認識能を有する生体分子が結合したものであっても良い。このような生体高分子は、前記官能基(A)が以下に示す結合を形成するので容易に導入することができる。即ち、前記官能基(A)がアルデヒド基の場合は、1級アミノ基と容易に反応し、シッフ塩基が形成され、また、該シッフ塩基は、水素化ホウ素ナトリウム等により温和な条件により還元され、リガンドと更に安定な結合を形成する。前記官能基(A)が水酸基である場合は、脱水縮合剤存在下、カルボキシル基と容易に反応し、エステル結合を形成する。前記官能基(A)がカルボキシル基である場合は、脱水縮合剤存在下、水酸基又はアミノ基と容易に反応し、エステル結合又はアミド結合を形成する。前記官能基(A)がアミノ基である場合は、脱水縮合剤存在下、カルボキシル基と容易に反応し、アミド結合を形成する。

前記特異的認識能を有する生体分子としては、一般に知られた分子生物学的な特異的認識能を有し、1級アミノ基、カルボキシル基あるいは水酸基を有する生体分子であればいかなる生体分子であっても良い。例えば、デオキシリボ核酸、糖、抗体に代表される蛋白質等の生体分子が好ましく挙げられる。

このような生体分子を有する本発明の粒子は、結合された生体分子の種類に応じて、例えば、遺伝子チップや蛍光イムノアッセイ等に用いる生物学的診断用材料とすることができる。

本発明の粒子を調製するには、例えば、前記特定の分子量を有する PEG 水溶液と、カドミウム塩と、前記半導体ナノ結晶とを反応させる製造法により得ることができる。具体的には、片末端にチオール基を有する数平均分子量 300~20000 のポリエチレン

グリコール水溶液とカドミウム塩とを反応させる工程(A-1)と、次いで、ZnX(Xは、O、S、Se又はTeを示す)のシェルを有するコアシェル構造のII-VI族半導体ナノ結晶を反応させる工程(B-1)とを含む方法(以下、第1の方法という)、若しくは表面にカドミウムを有する半導体ナノ結晶の溶液を得るために、ZnX(Xは、O、S、Se又はTeを示す)のシェルを有するコアシェル構造のII-VI族半導体ナノ結晶の表面にカドミウムを付加する工程(A-2)と、得られた表面にカドミウムを有する半導体ナノ結晶の溶液と、片末端にチオール基を有する数平均分子量300~20000のポリエチレングリコール水溶液とを反応させる工程(B-2)とを含む方法(以下、第2の方法という)等により得ることができる。

第1及び第2の方法に用いる特定の分子量を有するPEG及び前記半導体ナノ結晶としては、それぞれ前述した具体例のものを好ましく用いることができる。

第1及び第2の方法に用いるカドミウム塩は、カドミウムを含む水溶性の塩であれば特に限定されず、例えば、塩化カドミウム、酢酸カドミウム、炭酸カドミウム、蟻酸カドミウム、硝酸カドミウム、硫酸カドミウム、過塩素酸カドミウム等が挙げられる。該カドミウム塩の使用量は、反応させる対象に応じて適宜選択して決定することができる。

第1の方法は、前記特定の分子量を有するPEGとカドミウム塩とを反応させる工程(A-1)の後、前記半導体ナノ結晶を反応させる工程(B-1)を行なうが、これらを同一の反応系内に同時に投入して反応させても同様な反応が得られる。

第1の方法としては、例えば、前記特定の分子量を有するPEGと、トリアルキルフォスフィン／トリアルキルフォスフィンオキシド中において合成して得られたアルキルフォスフィン／アルキルフォスフィンオキシドで修飾された前記半導体ナノ結晶とを、水又は緩衝溶液と有機溶媒との混合系中でカドミウム塩の存在下にPEG化反応させる方法等が挙げられる。

前記PEG化反応は、通常、不活性ガス雰囲気下、4~60℃で0.5~3時間の条件で行うことができる。

一方、第2の方法としては、例えば、前記アルキルフォスフィン／アルキルフォスフィンオキシドで修飾された半導体ナノ結晶の表面にカドミウムを付加させ、表面にカドミウムを有する半導体ナノ結晶を得る工程(A-2)の後、前記特定の分子量を有するPEGを、水又は緩衝溶液と有機溶媒との混合系中でPEG化反応させる工程(B-2)を行なう方法等が挙げられる。

前記工程(A-2)の反応は、例えば、不活性ガス雰囲気下、60～300℃、1 分間～1 時間の条件等により行うことができるが、この際、例えば、硫黄含有溶液を滴下して半導体結晶表面にカドミウムを CdS として付加することもできる。

前記工程(B-2)の PEG 化反応は、例えば、不活性ガス雰囲気下、4～60℃で 0.5～3 時間の条件で行うことができる。

第 1 及び第 2 の方法において、PEG 化に用いる有機溶媒としては、前記特定の PEG 及び前記トリアルキルフォスフィン／トリアルキルフォスフィンオキシドにより修飾された半導体ナノ結晶の両者が可溶な溶媒であれば特に限定されず、例えば、クロロホルム、ジクロロメタン、ベンゼン、トルエン、キシレン、酢酸エチル、酢酸メチル、酢酸ジイソプロピル、ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド、ジメチルアセトアミド等が好ましく挙げられる。

該有機溶媒は、通常、前記半導体ナノ結晶濃度が  $2\mu\text{g}/\text{ml}$ ～ $20\text{mg}/\text{ml}$  程度になる割合で用いられる。

第 1 及び第 2 の方法において、前記特定の分子量を有する PEG の使用量は、通常、前記半導体ナノ結晶構成元素に対して 0.1 モル当量以上の過剰量使用するので、反応終了後、最終的に生ずる、未反応の特定の分子量を有する PEG を除去する必要がある。該除去は、例えば、遠心分離により得られる本発明の粒子を沈積させる方法、あるいは透析操作又はカラムにより特定分子量を有する PEG を除去する方法等により行うことができる。

第 1 又は第 2 の方法において、PEG 化反応させた後に本発明の粒子を得るには、例えば、PEG 化反応後の反応液に、非極性有機溶媒を添加し、有機相及び水相に二相分離することで、水相に溶解状態の本発明の粒子を得ることができる。このような本発明の粒子は、用途に応じてそのまま使用することができる他、抽出精製、乾燥等により粉末粒子として得ることもできる。

前記非極性有機溶媒とは、主に炭化水素系の有機溶媒であり、例えば、ペンタン、ヘキサン、ヘプタン、オクタン等が挙げられる。

本発明の PEG 修飾半導体ナノ粒子は、特定分子量の PEG が半導体ナノ結晶の表面に結合しているので、蛍光強度の低下が有効に抑制され、水中に安定分散させることができ、また、該特定分子量の PEG が特異的認識能を有する生体分子を有する場合には、特に、生物学的診断用材料として有用である。

本発明の製造法では、カドミウムを介して特定分子量の PEG と特定の半導体ナノ



結晶を反応させるので、蛍光強度の低下が有効に抑制され、水中に安定分散させることができる半導体ナノ粒子を簡便に製造することができる。

#### 実施例

以下実施例により本発明を更に詳細に説明するが本発明はこれらに限定されない。

#### 製造例 1

#### ZnS シェルを有する CdSe 半導体ナノ結晶(CdSe-ZnS 半導体ナノ結晶)の溶液の調製

半導体ナノ結晶の合成は、Qu 等;J.Amer.Chem.Soc.,129(4)2049(2002)に記載の方法に準じて以下に示す合成方法により行った。

##### (セレン溶液の調製)

セレン 319.6mg をナス型フラスコに秤とり、アルゴン雰囲気下、トリブチルホスフィン 1.186ml(以下 TBP と略す)及びジオクチルアミン 8.51ml(以下 DOA と略す)をシリンジ操作により加えた。セレンが完全に溶解し、無色透明の溶液が得られるまで室温で攪拌を行った。得られたセレン溶液は、使用する直前まで冷蔵保存した。

##### (CdSe ナノ結晶の溶液の調製)

冷却管、温度計及び 3 方コックを装着した 3 ッロフラスコをアルゴン置換し、酸化カドミウム(CdO)50.8mg 及びステアリン酸 456mg を導入し、150℃に加熱することにより CdO を完全に溶解させた。反応容器を室温付近まで冷却した後、トリオクチルホスフィンオキシド 7.76g(以下 TOPO と略す)及びヘキサデシルアミン 7.76g(以下 HDA と略す)を加え、300℃まで昇温することにより無色透明の溶液を得た。続いて、前記セレン溶液 1ml(Cd/Se=1/1)をシリンジ操作により一度に加えて反応を開始した。反応開始より 7 分後に反応を停止し少量の反応溶液を採取し、UV 照射し蛍光体を得られたことにより CdSe ナノ結晶が得られていることを確認した。従って、得られた反応液は、CdSe ナノ結晶の溶液であることが判った。

##### (Zn/S 含有溶液の調製)

ナス型フラスコをアルゴンガスによって置換し、ジエチル亜鉛 1M ヘプタン溶液 1ml(1mmol)、ビストリメチルシリルスルフィド 267  $\mu$ l(1.257mmol)及び TBP 7.5ml をシリンジ操作により導入し反応させて Zn/S 含有溶液を得た。この溶液は使用直前まで冷蔵保存した。

##### (CdSe-ZnS 半導体ナノ結晶の溶液の調製)

冷却管、温度計及び 3 方コックを装着した 3 ッロフラスコをアルゴン雰囲気にした

後、前記で調製した CdSe ナノ結晶の溶液 2.5ml を導入し、220℃に加熱した。次に、前記 Zn/S 含有溶液 1.4ml( $\text{Cd/Zn}=1/4$ )を 1 滴/5 秒の速度でゆっくり滴下した。滴下終了後、浴温度を 100℃まで冷却し、更に 1 時間攪拌を続けた。反応終了後、反応混合物を適量(2~10 倍容量)のクロロホルムに溶解させた後、僅かに不溶物が生成するまでメタノールを加えた。遠心操作により不溶物を沈積させた後、デカンテーションにより上澄みを除去し、CdSe-ZnS ナノ結晶の沈積物を得た。得られた沈積物に、該沈積物中の CdSe 含量が  $10 \mu\text{mol/ml}$  となるようにクロロホルムを加え溶解させ、CdSe-ZnS ナノ結晶の溶液を得た。

#### 製造例 2

##### ZnS シェル表面に CdS を付加した CdSe 半導体ナノ結晶(CdSe-ZnS-CdS 半導体ナノ結晶)の溶液の調製

##### (S 含有溶液の調製)

ナス型フラスコをアルゴンガスによって置換した後、ビストリメチルシリルスルフィド  $267 \mu\text{l}$ (1.257mmol)及び TBP 8.5ml をシリンジ操作により導入し、S 含有溶液を得た。この溶液は使用直前まで冷蔵保存した。

##### (CdSe-ZnS-CdS 半導体ナノ結晶の合成)

冷却管、温度計及び 3 方コックを装着した 3 ッロフラスコをアルゴン雰囲気とし、製造例 1 で調製した CdSe-ZnS 半導体ナノ結晶の溶液 2.5ml を加え、クロロホルムを留去した後に、TOP 0.1g 及びステアリン酸カドミウム 7.8mg を導入し 220℃に加熱した。更に、前記 S 含有溶液  $175 \mu\text{l}$ ( $\text{CdSe/CdS}=1/0.5$  となる量)を 1 滴/5 秒の速度でゆっくりと滴下した。滴下終了後、浴温度を 100℃まで冷却した後、更に 1 時間攪拌を続けた。反応終了後、反応混合物を適量(2~10 倍容量)のクロロホルムに溶解させた後、僅かに不溶物が生成するまでメタノールを加えた。遠心操作により不溶物を沈積させた後、デカンテーションにより上澄みを除去し、CdSe-ZnS-CdS 半導体ナノ結晶である沈積物を得た。得られた沈積物に、沈積物中の CdSe 含量が  $10 \mu\text{mol/ml}$  となるようにクロロホルムを加え、CdSe-ZnS-CdS 半導体ナノ結晶の溶液を調製した。

#### 製造例 3

##### $\alpha$ -アセタール- $\omega$ -チオール-PEG(ヘテロ二官能性 PEG)の合成

$\alpha$ -アセタール- $\omega$ -チオール-PEG の合成は、秋山等;Bioconj.Chem,11(6)947 2000)に記載の方法に従って以下に示すとおりに合成した。

3,3-ジエトキシ-1-プロパノールにカリウムナフタレン処理を行った後、エチレンオキシドの重合を行った。得られた $\alpha$ -アセタール- $\omega$ -OH-PEGの末端水酸基をメタンスルホニル化、O-エチルジチオカーボネート化及び還元反応を経て $\alpha$ -アセタール- $\omega$ -チオール-PEGを合成した。 $\alpha$ -アセタール- $\omega$ -チオール-PEGの分子量は、開始剤とエチレンオキシドの量的関係を操作することにより調整し、数平均分子量 5000 及び 2000 の 2 種類のヘテロ二官能性 PEG を得た。得られた各ヘテロ二官能性 PEG は、 $^1\text{H}$ -NMR 及び GPC を用いて分析した結果、末端官能基が定量的に導入された所定分子量の $\alpha$ -アセタール- $\omega$ -チオール-PEGであることを確認した。

#### 実施例 1

##### PEG 修飾 CdSe-ZnS 半導体粒子の調製

製造例 1 で調製した CdSe-ZnS 半導体ナノ結晶の溶液 100  $\mu\text{l}$  に、製造例 3 で調製した数平均分子量 5000 のヘテロ二官能性 PEG 50mg 及び  $\text{CdCl}_2$  1.65mg を溶解させたリン酸緩衝液 1ml を加え、斜光下、室温において激しく攪拌した。30 分後、n-ヘキサン 10ml 及びリン酸緩衝液 9ml を加え、更に 5 分間激しく攪拌を行った。静置、分液させた後に UV(254nm)を照射したところ、下層(水相)のみに蛍光が認められた。

一方、 $\text{CdCl}_2$ を添加しなかった場合は上層(有機相)のみに蛍光が認められた。従って、カドミウム塩を反応させることにより、ヘテロ二官能性 PEG が CdSe-ZnS 半導体結晶表面に結合し、該半導体結晶を水溶化することが明らかとなった。

更に、上下層を分液した後に蛍光スペクトルを測定した結果、水相の蛍光スペクトルは、水溶化前のピーク位置、半値幅及び蛍光強度を保持していることが確認された。

#### 実施例 2

##### PEG 修飾 CdSe-ZnS-CdS 半導体粒子の調製

製造例 2 で調製した CdSe-ZnS-CdS 半導体ナノ結晶の溶液 100  $\mu\text{l}$  に、リン酸緩衝液 1ml 及び製造例 3 で調製した数平均分子量 2000 のヘテロ二官能性 PEG 20mg を加え、斜光下、室温において激しく攪拌した。30 分後、n-ヘキサン 10ml 及びリン酸緩衝液 9ml を加え、更に 5 分間激しく攪拌を行った。30 分後、n-ヘキサン 10ml 及びリン酸緩衝液 9ml を加え、更に 5 分間激しく攪拌を行った。静置、分液させた後に UV(254nm)を照射したところ、下層(水相)のみに蛍光が認められた。

次いで、得られた溶液を超遠心操作(230000g $\times$ 20 分)し、沈積物を沈積させた。上澄みを分離後、リン酸緩衝液を加え、同様の操作を更に 2 回繰り返した。得られた PEG 修飾 CdSe-ZnS-CdS 半導体粒子を凍結乾燥後、 $^1\text{H}$ -NMR( $\text{D}_2\text{O}$ 、積算 64 回)を測定す

ることにより、PEG 化状況を確認した。この結果、PEG 由来のプロトンのみが観測され、アルキルフォスフィン／アルキルフォスフィンオキシド及びヘキサデシルアミンに由来するメチルプロトンは、全く観測されなかった。

上記調製した PEG 修飾 CdSe-ZnS-CdS 半導体粒子の溶液を石英セルにとり、分光光度計により 37℃における透過光の経時変化を 180 時間測定した(透過光波長 700nm)。この結果、透過率の変化は全く認められず、生理条件下において PEG 修飾 CdSe-ZnS-CdS 半導体粒子が凝集及び析出することなく安定に分散していた。また、経時変化測定後のサンプルに UV(254nm)を照射したところ、サンプルが均質に発色していることが確認された。

### 実施例 3

#### ビオチン-PEG 修飾量子ドットの調製

製造例 3 で調製した数平均分子量 5000 のヘテロ二官能性 PEG を水溶液とした後、1N 及び 0.1N 塩酸を滴下して pH=2.1 とした。室温において 2 時間攪拌した後に、1N 及び 0.1N 水酸化ナトリウムを加え pH=8 とした。この溶液を、透析操作により脱塩し、凍結乾燥することにより  $\alpha$ -アルデヒド- $\omega$ -チオール-PEG をえた。 $\alpha$ -アルデヒド- $\omega$ -チオール-PEG を水溶液とした後に同モル量のビオチンヒドラジドを加え、室温にて攪拌した。2 時間後に  $\text{NaBH}_4$  を加え、更に 1 時間攪拌した。この溶液を上述と同様に透析／凍結乾燥を行った。その結果、得られた化合物が  $\alpha$ -ビオチン- $\omega$ -チオール-PEG であることを  $^1\text{H-NMR}$  及び GPC により確認した。

次に、製造例 3 で調製した数平均分子量 2000 のヘテロ二官能性 PEG の代わりに、上記で得られた  $\alpha$ -ビオチン- $\omega$ -チオール-PEG を用いた以外は、実施例 2 と同様に行い、 $\alpha$ -ビオチン- $\omega$ -チオール-PEG 修飾 CdSe-ZnS-CdS 半導体粒子であるビオチン-PEG 修飾量子ドット(生物学的診断材料)を調製した。

一方、生物学的診断用材料の比較のため、 $\alpha$ -メトキシ- $\omega$ -チオール-PEG を用いて、同様な方法により、 $\alpha$ -メトキシ- $\omega$ -チオール-PEG 修飾量子ドットを調製した。

得られたビオチン-PEG 修飾量子ドット及び  $\alpha$ -メトキシ- $\omega$ -チオール-PEG 修飾量子ドットをそれぞれ PBS 溶液に溶解した後、市販のテキサスレッドラベル化アビジンを添加し、室温にて攪拌した。1 時間後、蛍光スペクトルを測定し(励起波長 400nm)、テキサスレッドに由来する蛍光スペクトルの積分値(ピーク面積)を算出した。このような方法によって、 $\alpha$ -ビオチン- $\omega$ -チオール-PEG 修飾量子ドット又は  $\alpha$ -メトキシ- $\omega$ -チオール-PEG 修飾量子ドットと、テキサスレッド化アビジンとの量的関係を変化

させて、量子ドットからテキサスレッドへのエネルギー移動について測定を行った。結果を図1に示す。

図1より、ビोजン-アビジンの特異的相互作用により量子ドットとテキサスレッドの距離が短くなり、効率的にエネルギー移動が起こることが判った。

本発明を好ましい実施態様について説明してきたが、当業者であれば、本発明の精神から逸脱することなく様々な変更や改変を容易に行なうことができる。従って、上記開示は単なる例示であり、限定的に理解されるべきではない。本発明は添付の請求の範囲によってのみ限定されるものである。

#### 請求の範囲

1. 片末端にチオール基を有する数平均分子量 300～20000 のポリエチレングリコールと、ZnX(X は O、S、Se 又は Te を示す)のシェルを有するコアシェル構造の II-VI 族半導体ナノ結晶とが、カドミウムを介して結合した構造を含み、且つ水溶性であるポリエチレングリコール修飾半導体ナノ粒子。
2. II-VI 族半導体ナノ結晶のコアが、CdS、CdSe、CdTe、ZnSe 及び ZnTe からなる群より選択される請求の範囲 1 の半導体ナノ粒子。
3. 前記ポリエチレングリコールが、片末端にチオール基、他端にアルデヒド基、水酸基、アミノ基及びカルボキシル基からなる群より選択される官能基(A)を有するヘテロ二官能ポリエチレングリコールである請求の範囲 1 の半導体ナノ粒子。
4. 前記ヘテロ二官能ポリエチレングリコールの官能基(A)に、特異的認識能を有する生体分子が結合してなる請求の範囲 3 の半導体ナノ粒子。
5. 片末端にチオール基を有する数平均分子量 300～20000 のポリエチレングリコール水溶液と、カドミウム塩と、ZnX(X は、O、S、Se 又は Te を示す)のシェルを有するコアシェル構造の II-VI 族半導体ナノ結晶とを反応させる請求の範囲 1 の半導体ナノ粒子の製造法。
6. 片末端にチオール基を有する数平均分子量 300～20000 のポリエチレングリコール水溶液とカドミウム塩とを反応させる工程(A-1)と、次いで、ZnX(X は、O、S、Se 又は Te を示す)のシェルを有するコアシェル構造の II-VI 族半導体ナノ結晶を反応させる工程(B-1)とを含む請求の範囲 1 の半導体ナノ粒子の製造法。
7. 表面にカドミウムを有する半導体ナノ結晶の溶液を得るために、ZnX(X は、O、S、Se 又は Te を示す)のシェルを有するコアシェル構造の II-VI 族半導体ナノ結晶の表面にカドミウムを付加する工程(A-2)と、得られた表面にカドミウムを有する半導体ナノ結晶の溶液と、片末端にチオール基を有する数平均分子量 300～20000 のポリエチレングリコール水溶液とを反応させる工程(B-2)とを含む請求の範囲 1 の半導体ナノ粒子の製造法。
8. 請求の範囲 4 の半導体ナノ粒子を有する生物学的診断用材料。

## 要約書

蛍光強度の低下が有効に抑制され、水中に安定分散させることができ、また、特異的認識能を有する生体分子の結合が容易な PEG 修飾半導体ナノ粒子、その簡便な製造法及び生物学的診断用材料を提供する。本発明の水溶性の PEG 修飾半導体ナノ粒子は、片末端にチオール基を有する数平均分子量 300～20000 の PEG と、ZnX(X は O、S、Se 又は Te を示す)のシェルを有するコアシェル構造の II-VI 族半導体ナノ結晶とが、カドミウムを介して結合した構造を含む。